



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA**

**TÍTULO**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC25922  
COMPARADO CON CIPROFLOXACINO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**MÉDICO CIRUJANO**

**AUTOR**

**ELBER CALDERÓN RODRIGO**

**ASESORES**

**DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ**

**Mg. JAIME POLO GAMBOA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

**ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES**

**Trujillo – Perú**

**2018**

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres: José y Milita**

Con mucho cariño y amor por ser los autores, motor y motivo en mi formación académica, y en el futuro de mi vida, por el apoyo incondicional en los momentos más críticos, y por mantener vivo mi sueño durante todo este tiempo para lograr mis objetivos.

### **A mis hermanas**

Con todo mi amor por su tolerancia, confianza, por su gran consideración y orientación para ser cada día mejor. Además por permitirme vivir en una vida espiritual y que mi profesión sea un apoyo para la sociedad.

### **A mi hija Zoe**

Con todo mi corazón por ser actualmente la razón más importante de mi vida para seguir superándome y cumplir mis objetivos en la profesión médica.

**Elber Calderón Rodrigo**

## **AGRADECIMIENTO**

### **A Dios**

Por permitirme llegar hasta aquí y lograr mis objetivos propuestos, por encaminarme por buenos senderos para siempre permanecer de pie. Por ser el único ser maravilloso que nos dio la vida y nos protege día a día.

### **A mis maestros y asesores**

Quienes depositaron su confianza en mí, orientaron y brindaron sus enseñanzas para poder ser un buen profesional. Gracias por inculcarme sus valores para desarrollar esta carrera profesional en base a ello.

### **A mi universidad**

Mi alma máter, donde día a día aprendí una enseñanza nueva y me brindaron los conocimientos para formarme en mi carrera médica.

**Elber Calderón Rodrigo**

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC25922 COMPARADO CON CIPROFLOXACINO, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

(EL AUTOR)

## ÍNDICE

<b>PÁGINAS PRELIMINARES</b>	
<b>PÁGINA DEL JURADO</b> .....	i
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iii
<b>DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD</b> .....	iv
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	v
<b>ÍNDICE</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA .....	1
1.2. TRABAJOS PREVIOS .....	2
1.3. TEORÍA RELACIONADO AL TEMA .....	3
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	7
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	7
1.6. HIPÓTESIS .....	8
1.7. OBJETIVOS .....	8
1.7.1. OBJETIVO GENERAL .....	8
1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	9
2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN .....	9
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA .....	11
2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD .....	12
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS .....	13
<b>III. RESULTADOS</b> .....	14
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	18
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	22
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	27

## RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar si el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* “romero” tenía efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino a dosis de 30  $\mu$ g, en un estudio in vitro. Se utilizaron diluciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 25%, 50%, 75% y 100%, se consideró un control negativo con agua destilada. Se realizaron 11 repeticiones por cada grupo estudiado. Encontrándose efecto inhibitorio a la dilución del 100% (17.36mm, DS:  $1.027 \pm 0.310$ ; IC 95%; 16.67-18.05) valores considerados como eficacia intermedia según la denominación CLSI ( $>21$ mm), no superando los valores alcanzados por el control positivo ciprofloxacino (29.82mm, DS:  $0.982 \pm 0.296$ ; IC 95%; 29.16-30.48mm). Al 75% el efecto inhibitorio fue (12.64mm, DS:  $1.027 \pm 0.310$ ; IC 95%; 11.95-13.33), al 50% fue (9.55mm, DS:  $0.522 \pm 0.157$ ; IC 95%; 9.19-9.9mm), mientras que al 25% no se observó efecto antibacteriano. El análisis ANOVA fue altamente significativo (0.000) asimismo los grupos estudiados fueron homogéneos según la prueba de Tukey. Se concluye que se presentó cierto grado de inhibición sobre *Escherichia coli* ATCC25922, no superando el halo de inhibición del ciprofloxacino.

**Palabras claves:** *Rosmarinus officinalis*, eficacia, halo, sensible, resistente, aceite esencial, medicina tradicional

## ABSTRACT

The main objective of this study was to assess whether the essential oil of *Rosmarinus officinalis* "rosemary" leaves had an antimicrobial effect against strains of *Escherichia coli* ATCC25922 compared to ciprofloxacin at doses of 30  $\mu$ g, in an *in vitro* study. Different dilutions of *Rosmarinus officinalis* essential oil were used, at 25%, 50%, 75% and 100%, as well as distilled water as negative control. 11 repetitions were performed for each group studied. An inhibitory effect for the dilutions was found: at 100% (17.36mm, DS:  $1.027 \pm 0.310$ ; IC 95%; 16.67-18.05), values considered to have an intermediate effectiveness according to CLSI ( $> 21$ mm), not exceeding the values achieved by the positive control with ciprofloxacin (29.82mm, DS:  $0.982 \pm 0.296$ ; IC 95%; 29.16-30.48mm). At 75%, inhibitory effect was (12.64mm, DS:  $1.027 \pm 0.310$ ; IC 95%; 11.95-13.33), at 50% (9.55mm, DS:  $0.522 \pm 0.157$ ; IC 95%; 9.19-9.9mm), while at 25% there was no antibacterial effect observed. The ANOVA analysis was highly significant (0.000) and the studied groups were homogeneous according to the Tukey-test. It is concluded that a certain degree of inhibition was shown on *Escherichia coli* ATCC25922, but not exceeding the zone of inhibition of ciprofloxacin.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, efficacy, zone of inhibition, susceptible, resistant, essential oil, traditional medicine

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA**

Hoy en día la incidencia de las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso ha aumentado progresivamente debido a la transmisión de microorganismos con propiedades patógenas y/o toxinas, por medio de los alimentos o agua contaminada que ingerimos día a día. Esta vía de colonización de los alimentos puede ser de carácter endógeno, o adquirirse en el proceso de transformación de estos, es decir, puede contaminarse por un microorganismo que esté presente en el medio ambiente en el cual se procesa y utiliza este producto como vector antes de ser consumido. <sup>1</sup>

Dentro de los microorganismos principales causantes de estas enfermedades encontramos a una bacteria Gram negativa, *Escherichia coli*, capaz de infectar el organismo debido a su propiedad innata de generar biopelículas para fijarse en la superficie de alimentos como por ejemplo el agua, verduras y carnes. Este mecanismo es idóneo para la contaminación y supervivencia de la bacteria en los productos alimenticios.<sup>2</sup>

Últimamente según estudios se ha corroborado que *E. coli* construye estas biocapas en la superficie de los alimentos, que antes se creía no se reproducía, por consiguiente, la bacteria es muy difícil de erradicar y hoy en día muestra una elevada tasa de resistencia primordialmente a las sustancias desinfectantes que se utiliza para su correcta asepsia. Es por ello, que los alimentos llegan hasta las familias con un elevado índice de contaminación, como resultado tenemos unos elevados brotes de infecciones gastrointestinales secundarias a la proliferación de este microorganismo.<sup>2, 3</sup>



Debido a la alta tasa de proliferación de cepas *E. coli* y el aumento de infecciones es que se está promoviendo el uso de la medicina natural proveniente de nuestra exquisita flora para obtener compuestos que nos brinden sus diversas propiedades en el ámbito de la salud que de cierta manera sea una alternativa o complemento el uso de medicamentos sintéticos.<sup>4</sup>

Perú, es uno de los países que cuenta con recursos botánicos que cuentan con diversas propiedades medicinales, aromáticas, culinarias; que si los introduciéramos al comercio para sus diversos usos obtendríamos excelentes productos. Las plantas adquieren su propiedad de ser medicinales debido a que poseen sustancias con utilidad en la terapéutica. Estos principios activos están compuestos por los aceites vegetales. Las plantas medicinales poseen en sus órganos sustancias que son usadas terapéuticamente. Sus principios activos están constituidos total o parcialmente por aceites esenciales. En este caso contamos con *Rosmarinus officinalis* (romero) y su efecto bactericida frente cepas de *E. coli*.<sup>4</sup>

## **1.2. TRABAJOS PREVIOS**

Zampini C. et al (Argentina - Tucumán, 2013) analizaron un estudio experimental donde demostraron la actividad antimicrobiana del extracto de romero ya que comprobaron que inhibía cepas de Gram negativos multirresistentes, entre ellos *E. coli*, llegando a obtener un halo de inhibición de 10.24  $\pm$  1.04mm con el empleo del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis*<sup>5</sup>

Castaño H. (Colombia - Medellín, 2010) realizó un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del *Rosmarinus officinalis* frente cepas de *E. coli* que está presente en los alimentos. Al final de su estudio concluyó que el halo de inhibición que obtuvo fue

de 12.03 +/- 1.46mm, así mismo utilizó aceite esencial sin embargo no encontró actividad antimicrobiana. <sup>6</sup>

Ruiz M. (Perú - Trujillo, 2016) En su tesis determinó el efecto de los extractos alcohólicos de *Rosmarinus officinalis* sobre de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido, para ello utilizó el método de microdilución. Determinó que los mayores diámetros de halos de inhibición se observan en las concentraciones de 50 mg/mL (28mm), 60 mg/mL (27mm) y 70 mg/mL (28mm) de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*.<sup>7</sup>

Rondón R. (Perú - Tacna, 2013) En su trabajo realizado acerca de la actividad in vitro del aceite del *Rosmarinus officinalis* frente a las cepas de *E. coli* obtuvo como resultado un halo de inhibición de 17mm +/- 1.32mm y una CMI de 6,83 mg/ml. Por lo tanto, corroboró la actividad bactericida del aceite frente cepas de *E. coli*.<sup>8</sup>

Guevara M. (Perú - Trujillo, 2013) Realizó un estudio acerca del efecto del *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de las cepas de *E. coli*, empleó aceite esencial 0.1ml, y obtuvo diámetros de inhibición contra *E. coli* de 11.32mm +/- 1.043 con una concentración del aceite al 100% y de 8mm a una concentración del 50%.<sup>9</sup>

### **1.3. TEORÍA RELACIONADO AL TEMA**

Un problema de salud actual y muy común es la enfermedad diarreica aguda de etiología generalmente infecciosa, la cual se define como la presentación de tres o más deposiciones líquidas o semilíquidas en un lapso de 24 horas con duración menor de quince días. Esta patología afecta a todos los grupos etáreos, pero tiene predilección por la población infantil menores de cinco años ya que estos pacientes son

los que tienden a deshidratarse con mayor facilidad. El patógeno productor de esta patología es *Escherichia coli* y que además presenta seis diferentes cepas las cuales tienen características diferentes, por ejemplo: enteropatógena, enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroinvasiva, con adherencia difusa y enteroagregativa.<sup>10</sup>

El cuadro clínico de esta patología producida por *E. coli* enteropatógena tiene un curso de gravedad, donde el signo cardinal es la diarrea además de fiebre. El período de incubación es de 3 a 24 horas seguido que la persona ingiere un gran número de bacterias con los alimentos. La noxa que produce *E. coli* se lleva a cabo a nivel de las células intestinales ya que actúa en la estructura de las proteínas del citoesqueleto de las células y la liberación de factores de virulencia.<sup>11</sup>

*E. coli* es una enterobacteria Gram negativa (debido a su color rojo que adquiere en la tinción Gram), anaerobio facultativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, posee el tamaño aproximado de 0,5u de ancho y 3u de longitud; móvil; no presenta esporas; se alimenta de la glucosa para luego fermentarla al igual que la lactosa, por ello se consideran catalasa positiva; producen nitritos por un proceso de reducción. Se caracteriza por ser parte en la mayoría de la microbiota perteneciente del intestino en donde cumple una función de comensales desde el momento del nacimiento. Este microorganismo es útil para diversas funciones esenciales del tubo digestivo como por ejemplo la producción de vitaminas B y K.<sup>12</sup>

La gran contaminación por agente microbianos supone un alto riesgo para la salubridad del individuo por consecuencia de la resistencia a algunos antibióticos de uso rutinario y a los componentes de origen sintético utilizados para los alimentos, son catalogados como potentes

tóxicos y teratogénicos. Como consecuente, se ha empezado a utilizar elementos naturales en este caso tenemos al aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).<sup>13</sup>

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es de origen mediterráneo su nombre etimológicamente tiene orígenes griegos “rhops” y “myrinos” (arbusto marino), pero actualmente se traduce como “aromático”. Pertenece a la familia Lamiaceae, que se caracteriza por sus tallos en forma de prisma y leñosos, hojas angostas, de pequeño tamaño, color verduzcas con un brillo en particular; son ricas en vitamina C. Su tamaño oscila desde medio metro a un metro de alto, sus flores nacen cada 6 meses y poseen un color azul claro con algunas manchas color violeta de aspecto alargadas y muy aromáticas.<sup>14</sup>

Contiene diversos compuestos químicos como ácidos fenólicos, flavonoides, alcoholes, aceite esencial. Sus hojas contienen ácido rosmarínico, derivado la rosmaricina (tiene función estimulante del sistema inmune) y el ácido carnósico cuya característica primordial es la inestabilidad de la capa bilipídica de la membrana celular. El proceso de degradación de esta planta se da por el aumento de temperatura y la excesiva exposición solar; cuando existen condiciones de oxigenación sufre un proceso de oxidación hasta carnosol, rosmanol y epirosmanol. Posee algunas propiedades medicinales importantes como: efecto bactericida, hepatoprotector, antiinflamatorias, cicatrizantes, antiséptico, analgésico, antirreumático.<sup>15,16</sup>

El aceite esencial de romero presenta principios biológicos activos que presentan función citotóxica, citoprotector a nivel de la membrana de los glóbulos rojos, antioxidante, anticancerosa y protege del daño oxidativo generado por la presencia de los radicales libres liberados por las células que cumplen su ciclo vital. Además, muestra beneficios

en la cognición y en el metabolismo de la glucosa, primordialmente en los pacientes con diabetes mellitus. Otro efecto importante es la alteración en la fermentación de los microbios, facilita la recaptación de calcio hacia los huesos; sin embargo, este aceite no cumple actividad en la mejoría de la inmunidad del ser humano e influye de manera suspicaz en la fertilidad.<sup>17, 29</sup>

El aceite esencial y el ácido carnósico tiene espectro amplio frente a bacterias ya que su mecanismo se basa en dañar la matriz extracelular consecuentemente al aumento de la permeabilidad y alteración parcial y completa de la estructura. Esta noxa es consecuencia de la inestabilidad de la capa bilipídica por la interrelación entre los terpenos con las sustancias propias de la membrana.<sup>18,27</sup>

El aceite esencial de la hoja del romero actúa específicamente sobre la matriz extracelular de las bacterias, su poder citotóxico interviene en el estadio de mitosis de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dentro de estas encontramos primordialmente a *E.coli*, *L.monocytogenes*, *S. aureus* que son sensible a los compuestos provenientes del extracto.<sup>19,20</sup>

La enfermedad diarreica es causada por *E. coli* como principal patógeno es por ello que para evitar las complicaciones como la deshidratación se instaura el esquema antibiótico eficaz para la abolición de la enfermedad infecciosa en este caso se presenta con una quinolona.<sup>21</sup>

Ciprofloxacino es un antibiótico perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, análogo sintético con espectro amplio contra bacterias Gram positivas y negativas. Inhibe la enzima ADN girasa y topoisomerasa IV durante su ciclo de división. Lo relevante de este

fármaco es su óptima cobertura frente bacterias Gram negativas como *E. coli* bloqueando irreversiblemente la replicación y transcripción de su ADN. <sup>21</sup>

#### **1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* “romero” tiene actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino a dosis de 30 ug, en un estudio in vitro?

#### **1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Las gastroenteritis son hoy en día un problema muy común en nuestro medio y el desafío terapéutico cada día es más amplio debido a la gran variedad de antibióticos disponibles, es por ello que cada día aumenta la resistencia a los patógenos debido a la negligencia de su uso, ya sea por tratamientos incompletos o por tiempos muy prolongados.

Debido a esta problemática el fin de este trabajo de investigación es la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que sean accesibles en nuestra comunidad, es por esto la inclusión de la hoja de *Rosmarinus officinalis* (romero) como estrategia natural dentro de la medicina alternativa, debido a la propiedad de sus principios activos.

Este trabajo busca demostrar el poder antimicrobiano del *Rosmarinus officinalis* (romero) contra cepas de *E. coli* que son hoy en día causantes principales de enfermedades gastrointestinales.

## **1.6. HIPÓTESIS**

H1: El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* (romero) tiene actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino a dosis de 30 ug, en un estudio in vitro.

H2: El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* (romero) no tiene actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino a dosis de 30 ug, en un estudio in vitro.

## **1.7. OBJETIVOS**

### **1.7.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* “romero” tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino a dosis de 30 ug, en un estudio in vitro.

### **1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* a la dilución del 25%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* a la dilución del 50%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* a la dilución del 75%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* a la dilución del 100%.
- Determinar efecto antibacteriano del ciprofloxacino a dosis de 30 ug.

## II. MÉTODO

### 2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Básico

**DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:** Experimental de serie de tiempo con repeticiones múltiples, post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Donde:

G1: Dilución del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 100%.

G2: Dilución del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 75%.

G3: Dilución del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 50%.

G4: Dilución del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* al 25%.

G5: Control positivo: ciprofloxacino, a dosis de 30 ug.

G6: Control negativo: alcohol.

O: Las observaciones

### 2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

Variable Independiente: Agente antibacteriano

a) No farmacológico: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero)

b) Farmacológico: Ciprofloxacino



Variable Dependiente: Eficacia antibacteriana

**Operacionalización de variables:**

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I: Agente antibacteriano	<p>Para el tratamiento frente a cepas de <i>E. coli</i> se utilizó:</p> <p>Tratamiento no farmacológico con el aceite esencial de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)<sup>6</sup></p> <p>Tratamiento farmacológico con ciprofloxacino.<sup>16</sup></p>	<p>El aceite esencial de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero) será dividida en las siguientes diluciones:</p> <p>a) 100% b) 75% c) 50% d) 25% e) Ciprofloxacino f) Alcohol</p>	<p>RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6</p>	Cualitativa nominal
V. D: Eficacia antibacteriana	Es la disminución de la producción de bacterias. <sup>30</sup>	<p>Se consideró eficaz si:<sup>25</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sensible para un diámetro mayor o igual a 21mm.</li> <li>▪ Intermedio para un diámetro entre 16 y 20 mm.</li> <li>▪ Resistente para un diámetro menor o igual a 15mm</li> </ul>	<p>Eficaz &gt;21mm</p> <p>No eficaz &lt;21mm</p>	Cualitativa nominal

### 2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

**POBLACIÓN:** Estuvo constituido por todas las colonias de *Escherichia coli* que crecieron en las placas Petri

#### **MUESTRA:**

**Tamaño de muestra:** En el estudio, se aplicó la fórmula para diferencia de dos proporciones. Se obtuvo 11 repeticiones por cada grupo de experimentación.<sup>22</sup> (Ver anexo 01)

**Unidad de análisis:** Cada grupo de colonias de *E. coli*

**Unidad de muestra:** Estuvo conformado por cada placa petri.

**Muestreo:** Se analizó el crecimiento de todas las colonias.

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN:**

##### **Criterios de inclusión:**

- Las placas petri en donde hubo crecimiento de bacterias.

##### **Criterios de exclusión:**

- Se excluyeron las placas con inexistencia de crecimiento bacteriológico.
- Placas Petri que se encontraron contaminadas.

## **2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD**

**LA TÉCNICA:** Consistió en la observación del crecimiento de los microorganismos en las placas petri.

**PROCEDIMIENTO:** Se consideraron los siguientes pasos:(Ver anexo 03)

- a. Tipificación de la planta por el Laboratorio de biología de la Universidad Particular Antenor Orrego.
- b. La obtención del principio activo (aceite esencial) del *Rosmarinus officinalis* (romero) fue mediante la técnica de arrastre de vapor de agua.<sup>8</sup>
- c. El proceso de cultivo de la bacteria fue mediante el método de Agar Miuller Hinton.
- d. Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12<sup>25</sup> y M100-S28<sup>26</sup> del CLSI.

**INSTRUMENTO:** Se empleó una tabla elaborada por el autor en la cual se registró las medidas en milímetros de los halos de inhibiciones según las diferentes concentraciones. (Ver anexo 06).

### **VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO**

El instrumento fue validado por 03 profesionales en el área de Salud, quienes analizaron y determinaron la viabilidad, seguridad, objetividad del experimento, tal efecto se concluyó después del análisis de las variables propuestas.

## 2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información transcrita en la ficha de recolección de datos fue procesada mediante el programa estadístico de SPSS 25 del sistema operativo Microsoft Windows XP, para la comparación entre los promedios de los halos de inhibición del crecimiento, obtenidos en cada concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero). Se utilizó para el estudio el método ANOVA y posteriormente la prueba post ANOVA de Tukey, para analizar la significancia estadística de los resultados, la homogenicidad de los grupos estudiados y determinar el grupo de experimentación que presentó mayor eficacia antibacteriana.

### III. RESULTADOS

**Tabla 01:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro

Datos Descriptivos								
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<b>100%</b>	11	17.36	1.027	0.310	16.67	18.05	16	19
<b>75%</b>	11	12.64	1.027	0.310	11.95	13.33	11	14
<b>50%</b>	11	9.55	0.522	0.157	9.19	9.90	9	10
<b>25%</b>	11	0.00	0.000	0.000	0.00	0.00	0	0
<b>Ciprofloxacino</b>	11	29.82	0.982	0.296	29.16	30.48	28	31
<b>Total</b>	55	13.87	9.911	1.336	11.19	16.55	0	31

**Fuente:** Reporte de resultados SPSS Ver. 25

**Tabla 02:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro

**TABLA RESUMEN DE ANOVA**

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5270.655	4	1317.664	1969.334	0.000
Dentro de grupos	33.455	50	0.669		
Total	5304.109	54			

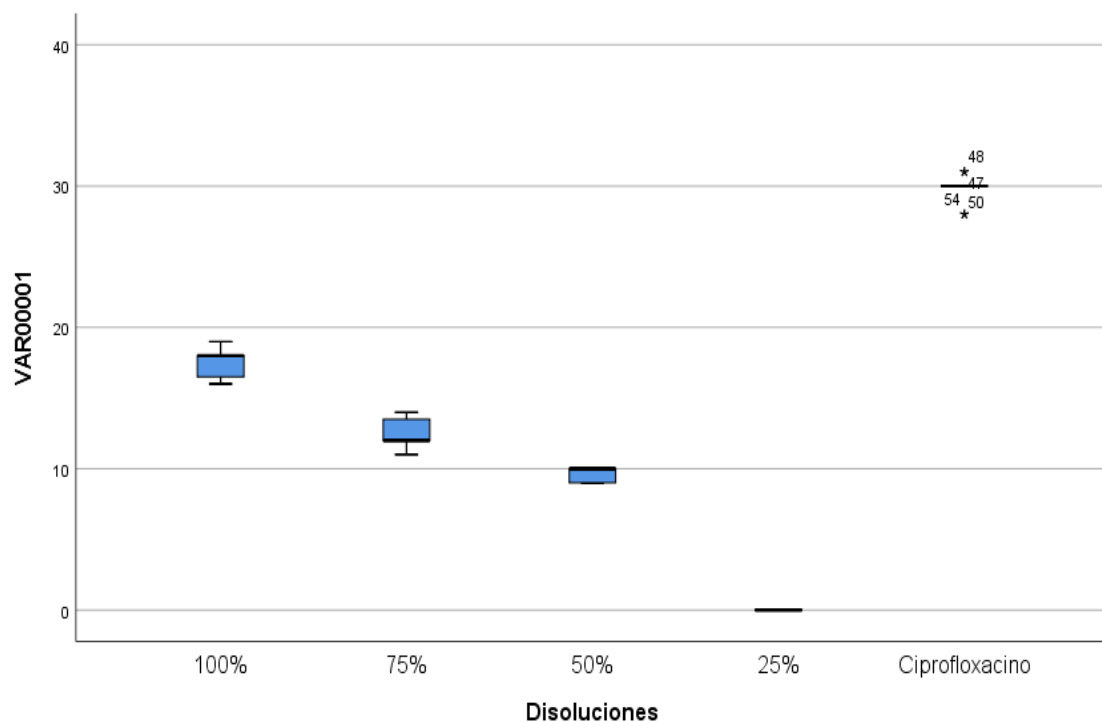
**Fuente:** Reporte de resultados SPSS Ver. 25

**Tabla 03:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro.

#### ANÁLISIS DE HOMOGENICIDAD DE LOS DATOS: TUKEY

		HSD Tukey <sup>a</sup>				
Disoluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
25%	11	0.00				
50%	11		9.55			
75%	11			12.64		
100%	11				17.36	
Ciprofloxacino	11					29.82
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.						
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 11,000.						

**Fuente:** Reporte de resultados SPSS Ver. 25



**Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25**

**Gráfico 01:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro.



#### IV. DISCUSIÓN

En el siguiente estudio de investigación experimental in vitro se investigó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) a concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% frente a la cepa de *Escherichia coli* comparado con el efecto antibacteriano de ciprofloxacino de 30ug. Se realizaron 11 repeticiones por cada grupo de experimentación. Se aplicó el criterio del CLSI para determinar la eficacia de los halos de inhibición (eficaz  $\geq 21$ mm).

En la tabla N° 01 en relación a los datos descriptivos se encontró que a la dilución de 100% el promedio del halo de inhibición fue de 17.36mm DS:  $1.027 \pm 0.310$ , IC 95% (16.67- 18.05) entre los rangos de 16 - 19mm, el valor del halo no supera a los rangos estipulados por CSLI ( $>21$ mm), se encuentra en el rango intermedio. A la dilución de 75% el promedio del halo de inhibición fue 12.64mm (DS:  $1.027 \pm 0.310$ ; IC 95%; 11.95mm-13.33mm); entre los rangos de 11mm y 14mm. A la dilución de 50% el promedio del halo de inhibición fue 9.55mm (DS:  $0.522 \pm 0.157$ ; IC 95%; 9.19mm-9.90mm); entre los rangos de 09mm y 10mm. A la dilución del 25% no se observó efecto inhibitorio, ya que presentó un halo de inhibición de 0mm. Por otro lado el promedio del halo de inhibición del grupo control con ciprofloxacino fue de 28.82mm (DS:  $\pm 0.982$ ; IC 95%; 29.16mm-30.48mm); el halo de inhibición mínimo 28mm y el máximo 31mm.

En la tabla N° 02 la prueba estadística de ANOVA (0.000), se evidenció que el estudio es altamente significativo; por otro lado en la tabla N°03 relacionada al análisis estadístico Post ANOVA de Tukey nos indica que los subgrupos experimentales fueron homogéneos y además muestra el grupo que tuvo mejor efecto antibacteriano fue ciprofloxacino.

A sí mismo en el grafico N°01 se puede evidenciar claramente que al comparar las medidas de los halos de inhibición, ciprofloxacino tiene

mayor efecto antibacteriano comparado con el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis*. Por lo tanto si bien es cierto que el aceite esencial muestra efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* a mayor dilución (100%) sin embargo no supera al efecto de ciprofloxacino.

Mayores halos de inhibición encontró Ruiz M.<sup>7</sup> (Trujillo, 2016) con un halo de inhibición de 27-28mm frente a cepas de *Escherichia coli* con el extracto alcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.

Resultados similares reportó Rondón R.<sup>8</sup> (Tacna, 2013) con  $17 \pm 1.32$ mm, el cual está dentro del rango intermedio de sensibilidad. Menores halos encuentran Zampini C. et al<sup>5</sup> (Tucumán, 2013) quienes determinaron el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas bacterias multirresistentes entre ellas *Escherichia coli*, obteniendo un halo de inhibición de  $10.24 \pm 1.04$ mm. Al igual Guevara M.<sup>9</sup> (Trujillo, 2013) encontró un halo de inhibición de  $11.32 \pm 1.043$ mm con el uso de aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas *E. coli*. Dichas medida se encontrarían dentro de los estándares de resistencia.

Castaño H.<sup>6</sup> (Medellín, 2010) utilizó extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas *E. coli* obteniendo un halo de inhibición de  $12.03 \pm 1.46$ mm demostrando así el efecto antibacteriano.

Por último podemos acotar que existen ciertas diferencias en los resultados encontrados en esta investigación comparado con los resultados de los antecedentes citados, podemos mencionar que existen factores externos influyentes para que existan estas diferencias en la obtención de los halos de inhibición como son: la calidad de suelo, el clima, la altitud de la zona donde fueron recolectadas las hojas de romero, el método utilizado para la obtención

del aceite esencial. Sin embargo esta investigación es de utilidad en el rubro de la profesión médica ya que permitirá utilizar el aceite esencial de las hojas de romero como coadyuvante al tratamiento antibiótico frente a cepas de *Escherichia coli*.

## V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC25922, pero menor que ciprofloxacino.
2. A la dilución de 25%, no se evidenció efecto antibacteriano frente cepas de *Escherichia coli* ATCC25922.
3. A las concentraciones de 75% y 50% se evidenció halos de inhibición de 12.64mm y 9.55mm respectivamente frente cepas de *Escherichia coli*, considerado por el CLSI, como resistente.
4. A la concentración de 100% el halo de inhibición fue de 17.36mm, considerado por el CLSI, como rango intermedio frente a la bacteria.
5. El ciprofloxacino a 30ug mostró un halo de inhibición 29.82mm.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudio con antibióticos y el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* como coadyuvante para evaluar si existe sinergia entre sí.
2. Utilizar el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a otros patógenos Gram negativos y Gram positivos.
3. Aplicar este estudio en animales para poder valorar la eficacia antibacteriana así como también el efecto citotóxico del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* que puede producir. Por otro lado nos permitirá conocer la dosis terapéutica en la población humana.
4. Realizar esta investigación con una preparación diferente como lo es el extracto etanólico, acuoso, alcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* para así determinar la eficacia de los diversos extractos o aceites.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. (Citado: 20/Agosto/2017). Disponible en: [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
2. Escobar A. Extractos de plantas como inhibidores de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* O157:H7. [Tesis]. México, 2010.
3. Puerta A, Mateos F. Enterobacterias. *Medicine*. 2010; 10(51): 3426-31. (Citado: 20/Agosto/2017). Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)
4. Velázquez D, Guyat A, Manzanares K, Aguirre B, Gelabert B. Etnobotánica: Empleo de plantas para uso medicinal. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*. 2014; 2(1): 10-14. (Citado: 20/Agosto/2017). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5237877.pdf>
5. Zampini C, Arias M, Cudmani N, Ordoñez R, Isla M, Moreno S. Antibacterial potential of non-volatile constituents of *Rosmarinus officinalis* against 37 clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *Rev Arge* 2013; 12 (2): 201 – 208. (Citado 20/08/2017) Disponible en: [http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/011\\_articulo\\_8.pdf](http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/011_articulo_8.pdf)
6. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la facultad de química farmacéutica* 2010; 17(2): 149-154. (Citado 20/08/2017) Disponible en: <http://aprendeonlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/6334/5835>
7. Ruiz M. Efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido. [Tesis]. Trujillo, Perú. 2016

8. Rondón R. Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. [Tesis]. Tacna, Perú. 2013.
9. Guevara M. Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento in vitro de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*. [Tesis]. Trujillo, Perú. 2013
10. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, editores. Harrison principios de medicina interna. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012.
11. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 8ª ed. España: Elsevier; 2010.
12. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica. Mex (44):464-475; 2012. (Citado 20/08/2017) Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S003636342002000500011&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S003636342002000500011&script=sci_arttext&tlng=pt)
13. Molina J, Eslava C. *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de microbiología y parasitología UNAM; 2015. (Citado 20/08/2017) Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
14. Ávila R, Navarro A, Vera A, Dávila R, Melgoza N, Meza R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar; 2011. (43): 23-36. (Citado 20/08/2017) Disponible en: <http://www.umar.mx/revistas/43/0430103.pdf>
15. Santoyo S, Cavero S, Jaime I, Ibañez E, Reglero G. Composición química y actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* L. aceite esencial obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos. Journal of Food Protection; 2005. 68 (4): 790-795. (Citado 20/08/2017) Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-68.4.790?code=fopr-site>

16. Vicente G. Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus officinalis*). [Tesis] Madrid. Universidad autónoma de Madrid, 2012.
17. Castaño A, Giro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. [Tesis] Colombia. Universidad de Antioquía, Medellín; 2010.
18. Purca T. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. [Tesis] Lima. Universidad Mayor de San Marcos; 2013.
19. Monroy A, Gonzales R, García I. Actividad antimicrobiana de extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y chile ancho (*Capsicum annuum* L. *grossum* sendt). México.
20. Coy B, Eunice G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Rev Cubana Plant Med*; 2013, 18 (2): 237-246 (Citado 20/08/2017) Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962013000200007&script=sci\\_abstract](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962013000200007&script=sci_abstract)
21. Katzung B, Trevor A, Masters S. Farmacología básica y clínica. 11<sup>a</sup> ed. México: McGraw-Hill; 2010.
22. Sosa J. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* Y *Enterococcus faecalis*. [Tesis] Lambayeque. Universidad Señor de Sipán; 2015.
23. Minsa. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de norma técnica N° 30 44 [Internet] 2002 [18 de noviembre de 2014]. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manual%20sensibilidad.pdf>.



24. Rondón R. Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. [Tesis]. Tacna, Perú 2013.
25. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
26. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>
27. Cebrian J. Diccionario de plantas medicinales. Barcelona: Edit. Integra; 2012.
28. Robbers J, Tyler V. Las hierbas medicinales de Tyler uso terapéutico de la fitomecinas. Barcelona:Edit. Acribia S.A; 2006.
29. Dawson B, Trapp R. Bioestadística Médica, 3ra. ed. México: Edit. Manual Moderno; 1999.
30. Fonegra R, Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. [Libro en línea] 2da ed. Colombia; 2007. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=K8el7ZeFpsC&pg=PA159&lpg=PA159&dq=Gomes%2C+E.+Cymbopogon+citratus.+Aspectos+Botanicos&source=bl&ots=>
31. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. MHT. Medicamentos Herbarios Tradicionales. 103 especies vegetales. PROTEGE. Red de Protección Social. [citado 16 sep 2016] Pág. 99-100. Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/8da25ec6bc518db0e04001011f016739.pdf>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO N°01

#### TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 p_1 q_1 + p_2 q_2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

$$Z_{\alpha} = 1.96^{22}$$

$$Z_{\beta} = 0.842^{22}$$

$$P_1 = 0.50^{24}$$

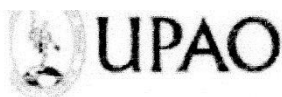
$$P_2 = 0.075^{24}$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.842)^2 (0.50 \times 0.5) + (0.075 \times 0.925)}{(0.50 - 0.075)^2}$$
$$n = \frac{(7.85) (0.25) + (0.07)}{0.18}$$

**n= 11 repeticiones por grupo**

## ANEXO N°02

### CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA



Museo de Historia Natural y Cultural

#### HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

#### CONSTANCIA N° 57-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

#### CONSTANCIA

Que **Elber Calderón Rodrigo**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

***Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: “Eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre *Escherichia coli* ATCC25922 comparada con ciprofloxacino”.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 9 de noviembre del 2018.



  
**Mg. Segundo Leiva González**  
Director  
Museo de Historia Natural y Cultural

## ANEXO N°03

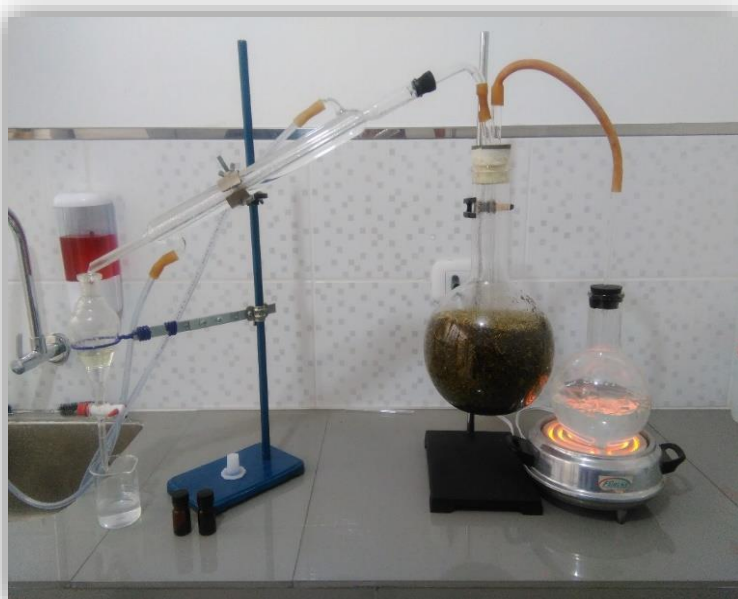
### EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA

#### 1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Rosmarinus officinalis* “romero”, se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 6 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujaron manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).

#### 2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el B2 estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en



un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.

## ANEXO N° 04

### TÉCNICA DE CULTIVO

#### 1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 11 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

#### 2. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100-S28.

##### a. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/ml).

##### b. Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal

modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



c. Preparación de las concentraciones del AE

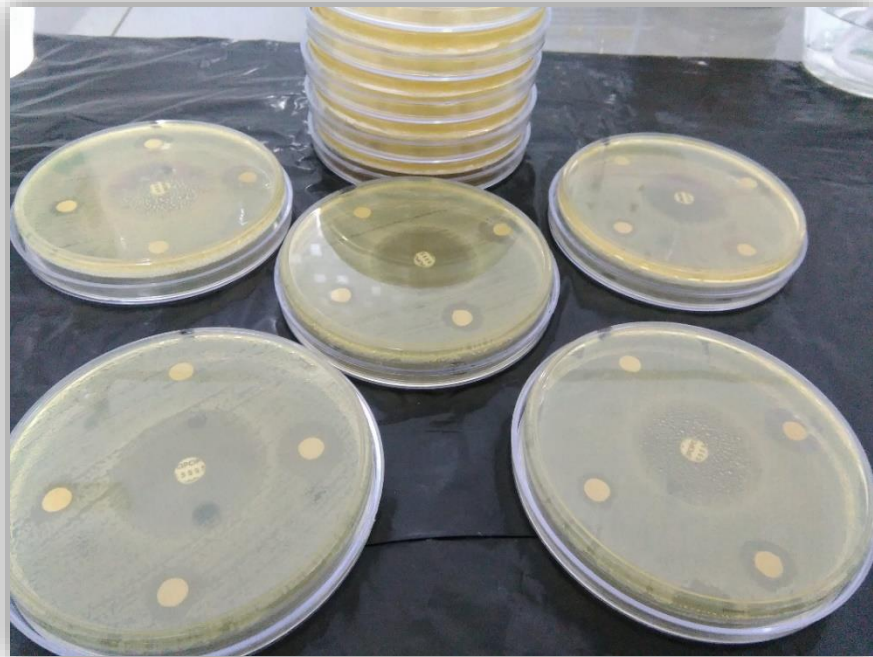
A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750  $\mu$ L de AE y 250  $\mu$ L de DMSO al tubo de 75%, 500  $\mu$ L de AE y 500  $\mu$ L de DMSO al tubo de 50%, y 250  $\mu$ L de AE y 750  $\mu$ L de DMSO al tubo de 25%.



d. Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10  $\mu\text{L}$  en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10  $\mu\text{L}$  de AE al 25% y se colocó en un disco, 10  $\mu\text{L}$  de AE al 50% en otro disco, 10  $\mu\text{L}$  de AE al 75% en otro disco y 10  $\mu\text{L}$  de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 11 veces.





e. Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Escherichia coli*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con ciprofloxacino (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f. Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta

medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Rosmarinus officinalis* “romero” y para el ciprofloxacino. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100-S28 del CLSI.



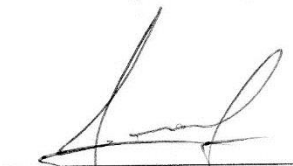
## ANEXO N°05

### VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE	X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:

  
Firma y sello  
Jaime A. Polo Granados  
CSP 3331

  
Dr. Steve T. H. Espinoza  
MICROSCOPIO CLINICO  
Especialista en Análisis Clínicos y Fisiológicos  
CSP: 2239 RNS: 0032  
RED ASISTENCIAL LA LIBERTAD  
Firma y sello

  
Firma y sello

## ANEXO N° 06

### INSTRUMENTO: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### MEDIDA DE HALO DE INHIBICIÓN EN PLACA PETRI

N°	ZONA DE INHIBICIÓN (mm)					
	Aceite esencial de Romero				Ciprofloxacino	suero fisiológico
	100%	75%	50%	25%		
Muestra N° 01	19	13	10	0	30	0
Muestra N° 02	18	12	10	0	30	0
Muestra N° 03	16	12	9	0	31	0
Muestra N° 04	16	11	10	0	31	0
Muestra N° 05	18	14	10	0	30	0
Muestra N° 06	18	13	10	0	28	0
Muestra N° 07	18	12	9	0	30	0
Muestra N° 08	17	14	10	0	30	0
Muestra N° 09	16	12	9	0	30	0
Muestra N° 10	18	12	9	0	28	0
Muestra N° 11	17	14	9	0	30	0

## **ANEXO N° 07**

### **MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD**

1. Ingreso restringido al laboratorio.
2. Utilizar siempre guardapolvo en la zona de trabajo.
3. El guardapolvo no debe de salir de la zona del laboratorio, excepto para enviarlo a lavar.
4. No pipetear con la boca.
5. Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio.
6. En caso de tener cabello largo, recogerlo y cubrirlo.
7. Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
8. Utilizar protección para los ojos cuando el procedimiento genere gotas o aerosoles.
9. Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
10. Las cortaduras o rasguños en las manos y brazos deben protegerse bien.
11. Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).
12. El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
13. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas por el operador antes y después de cada actividad.
14. Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
15. Todos los laboratorios deben tener a disposición un equipo de primeros auxilios.
16. Informar inmediatamente cualquier accidente al jefe de laboratorio.
17. Debe disponer de un lugar para el lavado de ojos en caso de exposición accidental a salpicaduras.

18. Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de eliminarlos en solución desinfectante o ser autoclavados a 121°C durante 20 minutos, o incinerarse.
19. El material infeccioso debe ser fácilmente identificado como tal y ser esterilizado lo antes posible.
20. Limpiar a diario los pisos con un trapeador limpio y solución desinfectante.

## ANEXO N° 08

### CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO



Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

### CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. CALDERÓN RODRIGO ELBER, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* "romero" frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro", durante los días 30 de julio al 3 de agosto de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 5 días del mes de agosto de 2018.

  
José Luis Calla Quevedo  
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO  
C.B.P. 0301

## ANEXO N° 09

### TABLA DE BASES DE DATOS

Comparaciones múltiples						
(I) Disoluciones		HSD Tukey		Sig.	Intervalo de	
		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error		confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100%	75%	4,727*	0.349	0.000	3.74	5.71
	50%	7,818*	0.349	0.000	6.83	8.81
	25%	17,364*	0.349	0.000	16.38	18.35
	Ciprofloxacino	-12,455*	0.349	0.000	-13.44	-11.47
75%	100%	-4,727*	0.349	0.000	-5.71	-3.74
	50%	3,091*	0.349	0.000	2.10	4.08
	25%	12,636*	0.349	0.000	11.65	13.62
	Ciprofloxacino	-17,182*	0.349	0.000	-18.17	-16.19
50%	100%	-7,818*	0.349	0.000	-8.81	-6.83
	75%	-3,091*	0.349	0.000	-4.08	-2.10
	25%	9,545*	0.349	0.000	8.56	10.53
	Ciprofloxacino	-20,273*	0.349	0.000	-21.26	-19.29
25%	100%	-17,364*	0.349	0.000	-18.35	-16.38
	75%	-12,636*	0.349	0.000	-13.62	-11.65
	50%	-9,545*	0.349	0.000	-10.53	-8.56
	Ciprofloxacino	-29,818*	0.349	0.000	-30.81	-28.83
Ciprofloxacino	100%	12,455*	0.349	0.000	11.47	13.44
	75%	17,182*	0.349	0.000	16.19	18.17
	50%	20,273*	0.349	0.000	19.29	21.26
	25%	29,818*	0.349	0.000	28.83	30.81

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.